

3/5/1

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI  
(c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

000916934

WPI Acc No: 72-77109T/197248

**Udp-glucuronic acid prepn - using microorganisms**

Patent Assignee: MARUKIN SYOYU CO LTD (MARU )

Number of Countries: 002 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 72046351	B						197248 B
US 3725201	A						197316

Priority Applications (No Type Date): JP 7035716 A 19700424

Abstract (Basic): JP 72046351 B

Comprises method of preparing UDP-glucuronic acid from UDP-glucose where living (or treated) cells of microorganism (belonging to G. Bacillus and capable of converting UDP-glucose to UDP-glucuronic acid) acts on UDP-glucose for accumulation of UDP-glucuronic acid. The conversion of UDP-glucose to UDP-glucuronic acid is catalysed by a potent enzyme, UDP-glucose dehydrogenase, in Bacillus species. Living cells, dried cells and ground cells can be applied directly to the reaction as crude enzyme prepn. This enzymatic reaction is accelerated by the addn. of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) or nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP). In this reaction system the starting material and the prodt. are not decomposed by disadvantageous side reactions.

Title Terms: GLUCURONIC; ACID; PREPARATION; MICROORGANISM

Derwent Class: B03; D16

International Patent Class (Additional): A61K-000/00; C07D-000/00;  
C12D-013/06

File Segment: CPI

1

## ④ UDP-グルクロン酸の製造法

① 特 願 昭45-35716

② 出 願 昭45(1970)4月24日

⑦ 発 明 者 杉森恒武

京都府乙訓郡向日町大字寺戸小字  
永田11の2

同 塚田陽二

京都市伏見区桃山町泰長老176  
の1観月橋団地9-202

同 田附康彦

枚方市御殿山南町3の61の406

⑧ 出 願 人 丸金醤油株式会社

香川県小豆郡内海町苗羽甲1850

代 理 人 弁理士 三枝八郎 外2名

## 発明の詳細な説明

本発明は肝臓に於ける解毒作用中、最も一般的  
なグルクロン酸抱合解毒に係わる因子として重要  
なUDP-グルクロン酸(ウリジン-5'-ジホ  
スフォ-グルクロン酸)の、新規でかつ有用度の  
高い製造法に関し、即ちバチルス属細菌群の培養  
によつて得られるUDP-グルコース脱水素酵素  
をUDP-グルコースに作用せしめることを特徴  
とするUDP-グルクロン酸の製造法に係るもの  
である。

従来UDP-グルクロン酸は動物の肝臓から直  
接抽出することにより、或はそれから抽出精製し  
たUDP-グルコース脱水素酵素をNAD(ニコ  
チン-アデニンジヌクレオチド)の共存下、U  
DP-グルコース(ウリジン-5'-ジホスフォ  
-グルコース)に作用させることによつて得られ  
ているが、これらの動物臓器利用法は資源的制約  
を受ける外に入手操作が甚しく煩雑で大量生産な  
ど不可能に近い。他方UDP-グルクロン酸の化  
学的合成法としては、UDP-グルコースを金属  
触媒の存在下に酸化する方法(特公昭38-

2

24384)、並に5'-UMP(5'-ウリジ  
ンモノリン酸)とグルクロン酸-1-リン酸とを  
反応させる方法(特公昭38-24385)が知  
られている。然るに微生物の培養によるUDP-  
グルコース脱水素酵素の生成に関しては、従来酵  
母中クリプトコッカス(Cryptococcus)属、  
細菌中ニューモコッカス(Pneumococcus)属、  
及びアエロバクテル(Aerobacter)属の僅か  
3種類にしか見出されておらず、しかも前2者は  
病原性を有するものである。更に上記3菌の生成  
する該脱水素酵素は何れもUDP-グルクロン酸  
への転換活性が低いのみならず、該酵素の精製と  
いう煩雑な操作を加えない限りUDP-グルコース  
中のジリン酸結合を切断する忌むしい副反応併  
起を免れない為長時間操作も不可能で、3菌の生  
成酵素とも未だUDP-グルクロン酸の実生産へ  
利用される望みなど全くない。

而して本発明者も微生物培養によるUDP-グ  
ルコース脱水素酵素の生成とこれを用いるUDP  
-グルクロン酸製法の研究とを多年に亘り進めつ  
つあつた所、遂に非病原性細菌で前記の両属とは  
全く別系統なるバチルス(Bacillus)属細菌が  
菌体内にUDP-グルコースのUDP-グルクロ  
ン酸への転換を触媒する強力な酵素(DDP-グ  
ルコース脱水素酵素)を生産し、かつ未精製酵素  
のままで前記の副反応を全く併起しない(その原  
因は未だ不明ではあるが)顕著な特徴を有するた  
め、極めて長時間に亘る連続操作も可能であつて  
所期UDP-グルクロン酸の工業的量を始めて  
可能となし得ると言う、何人も想到しなかつた新  
規事実を発見しこれに基づいて前記要旨から成る  
本発明を完成するに至つた。

本発明の原料物質たるUDP-グルコースは近  
年乾燥酵母菌体の作用により、5'-UMPとグ  
ルコースとから容易に生産し得る方法が開発され  
て来たので(柄倉外著、発酵と代謝、第20巻、  
第18頁、1969年)、本発明原料として工業

的に充分供給できるものである。また本発明に於けるバチルス属細菌群は、酵素源として培養液から分取したままの生菌体、その乾燥菌体、又は菌体破砕物等が何れも使用せられ、菌体は細菌培養の常法によつて取得される。更に本発明に於てこれらの酵素源をUDP-グルコースに作用させるに当つては、適当濃度のNAD又はNADPの添加が一層効果的であることも見出された。

次に本発明に於ける反応経過並に物質収支を例示すれば、第1表の如くであつた。即ち $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g、 $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2mg、クエン酸 0.2g、酵母エキス5g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  \*

\*  $12\text{H}_2\text{O}$  2g、及びグルコース10gを含む培地1ℓ (pH7) 中へ、同じ培地に20時間前培養した *Bacillus licheniformis* IAM 11054の種培養液を10%接種し、30℃で6時間振盪培養した後集菌並に洗滌し、これを0.05M リン酸緩衝液 (pH7) 中に懸濁せしめ、20Kcで10分間超音波処理して菌体破砕液を調製し、このものを酵素液とする。次いでUDP-グルコース 6.8mM、NAD 8mM、0.1M グリシン緩衝液及び該酵素液を含む反応液 (pH 7.5~9.5) を調製し、30℃で20時間反応せしめ残存UDP-グルコース及び生成UDP-グルクロン酸を測定した。

第 1 表

	反 応 液 1 ml 中	
	反 応 開 始 時	反 応 20 時間後
残存UDP-グルコース	3.82mg (6.76 μモル)	2.32 mg (4.08 μモル)
生成UDP-グルクロン酸	0	1.36 mg (2.36 μモル)

生成したUDP-グルクロン酸の精製は、常法の如く反応液をイオン交換樹脂 Dowex 50W ( $\text{H}^+$  型) カラムで処理してNADを除去後、イオン交換樹脂 Dowex 1 (ギ酸型) カラムを通して残存UDP-グルコースと生成UDP-グルクロン酸とを分画分取得し、UDP-グルクロン酸分画は活性炭処理して酸を活性炭に吸着せ\*

\*しめ、これをアンモニア性エタノールで溶出した後濃縮する方法によつて行い、反応液5mlから精製UDP-グルクロン酸粉末5.8mgを得た。この精製物の分析値は第2表の如くであつて、ウラシル塩基1分子に対し2分子のリン酸及び1分子のクロン酸を含むことから、純UDP-グルクロン酸のそれと一致することが判つた。

第 2 表

	ウラシル 1モルに対する分析値 (モル)				
	リ ン 酸			クロン酸の定量方法	
	無機-P	15分-P	有機-P	カルバゾール-硫酸法	ナフトレゾルシン法
測定値	0	0.92	1.94	0.94	0.99
計算値*	0	1.00	2.00	1.00	1.00

\*UDP-グルクロン酸として計算した値

また上記分析値の精製物は、マウス肝臓から調製したUDP-トランスグルクロニダーゼの存在下、O-アミノフェノールと反応してO-アミノフェニ

ールグルクロナイドを形成し、グルクロン酸抱合能を示した。このことは第3表中のOD500mμの吸光値が示す如く、対照に用いたUDP-グルクロン酸標品 (Sigma chemical Co. 製)

と同程度のアゾ色素生成能を示す(G. J. Dutton and I. D. E. Storey, Methods in Enzymol., vol. 5, 1962, P. 159, Academic Press)※

※ことから明らかであり、これらの知見を総合して本発明により生成する物質はUDP-グルクロン酸と同定された。

第 3 表

試 料	供 試 量	OD 500 mμ
反 応 生 成 物	258 μg	0.175
UDP-グルクロン酸標品 (Sigma Chemical Co.製)	248 μg	0.189
UDP-グルコース 標 品 (Sigma Chemical Co.製)	2038 μg	0

以上述べた如く本発明は従来何人も着目しなかつたバチルス属細菌の菌体内酵素を利用し、UDP-グルコースを能率よくUDP-グルクロン酸に転換せしめるものであつて、任意の規模で培養し容易に得られる生菌体、乾燥菌体または菌体破砕物が何れも酵素として直接使用できる。従つて本発明では従来法と違つて酵素を抽出精製するなどの煩雑な操作を全く必要としないこと、並に原料UDP-グルコースや生成UDP-グルクロン酸が分解されるなどの副反応が見られない為、生成物の単離精製が容易である許りでなく未反応UDP-グルコースが原料として支障なく再用し得ること等の顕著な特徴があり、特に量産の見地からも産業上大きな寄与をなすものである。

次に本発明の実施例を示す。

#### 実施例 1

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02%、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2%、クエン酸 0.02%、酵母エキス 0.5%、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.2%、及びグルコース1%からなる培地中に *Bacillus licheniformis* IAM 11054 を接種し、30℃で6時間振盪培養して得た生菌体を超音波処理し、菌体破砕液を調製する。これを酵素液とし、NAD 8 mM の存在下、pH 7.5~9.5 温度30℃で20時間

UDP-グルコースに作用せしめ、UDP-グルコース3.5%からUDP-グルクロン酸2.0%を生成し、これをイオン交換クロマトグラフィー及び活性炭吸脱着法により精製してUDP-グル

#### 実施例 2

実施例1と同組成の培地に *Bacillus licheniformis* IAM 11054 を接種し、37℃で6時間振盪培養して得た生菌体を20 実施例1と同じ条件でUDP-グルコースに作用せしめ、UDP-グルコース3.5%からUDP-グルクロン酸0.6%を調製した。

#### 実施例 3

実施例2と同様に培養して得た *Bacillus licheniformis* IAM 11054 の菌体を、減圧下に硫酸入デシケーター中で迅速乾燥せしめ、得られた乾燥菌体を実施例1と同じ条件でUDP-グルコースに作用せしめ、UDP-グルコース3.5%からUDP-グルクロン酸1.6%を30 調製した。

#### 実施例 4

実施例1と同組成の培地に *Bacillus cereus* IFO 3001 を接種し、37℃で6時間振盪培養して得た菌体を実施例1と同じ条件で35 件でUDP-グルコースに作用せしめ、UDP-グルコース3.5%からUDP-グルクロン酸0.3%を調製した。

#### 実施例 5

実施例1と同様に培養して得た *Bacillus licheniformis* NIAH 157 の生菌体から調製した菌体破砕液を実施例1と同条件でUDP-グルコースに作用せしめ、UDP-グルコース3.5%からUDP-グルクロン酸2.5%を得た。

7

## 実施例 6

実施例1と同様に培養して得た *Bacillus licheniformis* AHU 1531の生菌体から調製した菌体破砕液を実施例1と同条件でUDP-グルコースに作用せしめ、UDP-グルコース 3.5mgからUDP-グルクロン酸 2.2mgを得た。

## 実施例 7

( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2%、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02%、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2mg%、酵母エキス0.2%、ペプトン0.5%及びグルコース1%からなる培地に実施例1と同様に培養して得た *Bacillus subtilis* var. *niger* IFO 3214の生菌体から調製した菌体破砕物を実施例1と同条件でUDP-グルコースに作用せしめ、UDP-グルコース 4.4mgからUDP-グルクロン酸 1.8mgを得た。

## 実施例 8

8

実施例7と同様にして得た *Bacillus megaterium* AHU 1240の生菌体から調製した菌体破砕物の実施例1と同条件でUDP-グルコースに作用せしめ、UDP-グルコース 4.4mgからUDP-グルクロン酸 0.6mgを得た。

なお実施例1～8に挙げた菌株はすべて日本微生物保存機関連盟の菌株目録、1968年増補版(英文)、第28、29及び32項(JFCC Catalogue of Cultures, Additional Edition, 1968, P28, 29 and 32)に夫々記載されている菌株である。

## 特許請求の範囲

1 バチルス属に属し、UDP-グルコースをUDP-グルクロン酸に転換し得る能力を有する微生物の生菌体または菌体処理物を、UDP-グルコースに作用せしめUDP-グルクロン酸を生成せしめることを特徴とするUDP-グルクロン酸の製造法。

